

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-281202

(43)Date of publication of application : 10.10.2001

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/483

(21)Application number : 2001-018130

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 26.01.2001

(72)Inventor : HASEGAWA YOSHIKAZU

YAMAMOTO TOMOHIRO

WATANABE KIICHI

IKEDA MAKOTO

NANKAI SHIRO

(30)Priority

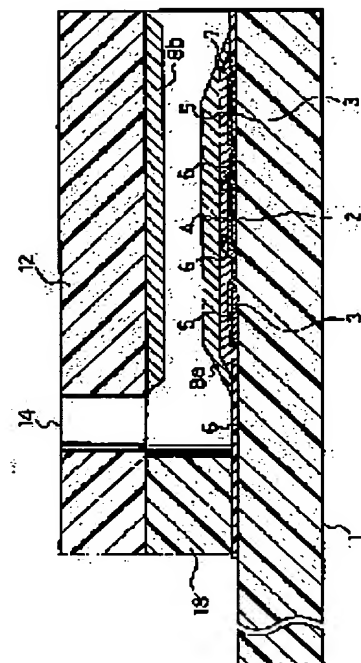
Priority number : 2000018834 Priority date : 27.01.2000 Priority country : JP

(54) BIOSENSOR AND ITS MANUFACTURING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a biosensor capable of speedily and highly accurately measurements by facilitating the dissolution of a reaction reagent system even in a sample liquid containing a high concentration of substrate.

SOLUTION: A reaction layer is formed by a method to dissolve a material which forms the reaction layer in a solvent formed of a sublimable substance, arrange the solution at the location of the formation of the reaction layer, freeze it, and sublime and remove the solvent in the solid of the frozen solution under a reduced pressure. By adopting the method, it is possible to enlarge the surface area of the reaction layer, facilitate its dissolution in a sample liquid, and perform speedy measurements.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-281202

(P 2001-281202A)

(43)公開日 平成13年10月10日(2001. 10. 10)

(51) Int. Cl. ⁷

識別記号

G01N 27/327

27/416

33/483

FI

G01N 33/483

27/30

27/46

審査請求 未請求 請求項の数10 O.L (全8頁)

テーマコード' (参考)

F 2G045

$$\mathbf{z}$$

B

R

G

(21)出願番号 特願2001-18130(P2001-18130)

(22)出願日 平成13年1月26日(2001.1.26)

(31)優先權主張番号 特願2000-18834(P2000-18834)

(32)優先日 平成12年 1 月27日(2000.1.27)

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 長谷川 美和

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 山本 智浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(74) 代理人 100072431

弁理士 石井 和郎

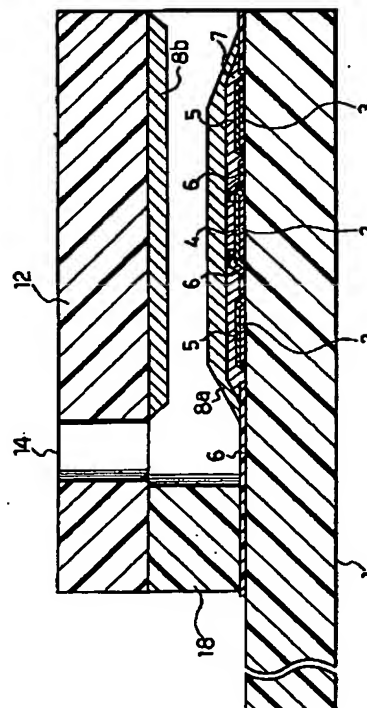
[最終頁に続く](#)

(54) 【発明の名称】 バイオセンサおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 高濃度の基質を含む試料液でも、反応試薬系が容易に溶解し、迅速に高精度の測定が可能なバイオセンサを提供する。

【解決手段】 反応層を形成する材料を昇華性を有する物質からなる溶媒に溶解し、その溶液を反応層形成位置に配置し、これを凍結した後、減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する方法によって反応層を形成する。この方法を採用することにより、反応層の表面積が大きく、試料液に溶解しやすくなり、迅速な測定が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極系上またはその近傍に、単独または複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法であって、前記反応層を形成する工程が、昇華性を有する物質からなる溶媒に溶解した前記試薬の溶液を前記反応層の形成位置に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなることを特徴とするバイオセンサの製造方法。

【請求項 2】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極系上またはその近傍に、複数の反応層として形成され、かつそのうちの特定の反応層のみが前記試薬系中の特定の少なくとも 1 種の試薬を含むバイオセンサの製造方法であって、前記特定の反応層を形成する工程が、昇華性を有する物質からなる溶媒に前記特定の反応層を含む試薬を溶解し、その溶液を前記反応層の形成位置に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなることを特徴とするバイオセンサの製造方法。

【請求項 3】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極系上またはその近傍に、単独または複数の反応層として形成され、かつ前記試薬系中の特定の少なくとも 1 種の試薬が複数層に積層された特定の反応層の最上層のみに含まれるバイオセンサの製造方法であって、前記特定の反応層を形成する工程が、前記最上層を除きその下層までを形成する工程、昇華性を有する物質からなる溶媒に前記特定の試薬を溶解し、その溶液を前記工程で形成された層上に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなることを特徴とするバイオセンサの製造方法。

【請求項 4】 前記基板上において基板との間に試料液を前記電極系へ導く試料液供給路を形成するカバー部材を有し、前記反応層が前記試料液供給路に露出するように形成され、かつ反応層の少なくとも 1 つが前記カバー部材側に形成されている請求項 1～3 のいずれかに記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 5】 前記酸化還元酵素がコレステロールの酸化反応を触媒する酵素であり、前記電子メディエータが前記酵素を含む層とは異なる層に含まれている請求項 2～4 のいずれかに記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 6】 前記酸化還元酵素がコレステロールの酸化反応を触媒する酵素であり、前記酵素を含む層がさらに界面活性剤を含む請求項 2～5 のいずれかに記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 7】 前記電子メディエータがフェリシアン化カリウムである請求項 1 に記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 8】 前記特定の試薬が、酸化還元酵素および電子メディエータのフェリシアン化カリウムの少なくとも一方である請求項 2 または 3 に記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 9】 前記反応層の少なくとも最下層が親水性高分子を含む請求項 1～8 のいずれかに記載のバイオセンサの製造方法。

【請求項 10】 請求項 1～9 のいずれかに記載のバイオセンサの製造方法により製造されたバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中の特定成分について、迅速、高精度、かつ簡便に定量することができるバイオセンサ、特にその反応層の形成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として、次のようなバイオセンサが提案されている（特開平 2-062952 号公報）。このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で測定極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に、親水性高分子と酸化還元酵素および電子メディエータを含む酵素反応層を形成したものである。この酵素反応層には、必要に応じて緩衝剤が加えられる。このようにして作製されたバイオセンサの酵素反応層上に、基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して、酵素と基質が反応し、さらに電子メディエータが還元される。酵素反応終了後、この還元された電子メディエータを電気化学的に酸化する酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。

【0003】 バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。グルコースの定量方法としては、グルコースオキシダーゼと酸素電極または過酸化水素電極とを組み合わせた方式が一般に知られている。グルコースオキシダーゼは、酸素を電子メディエータとして基質である β -D-グルコースを D-グルコノ- δ -ラクトンに選択的に酸化する。この反応にともない酸素は過酸化水素に還元される。このときの酸素消費量を酸素電極によって測定するか、または過酸化水素の生成量を白金電極等を用いた過酸化水素電極によって測定することにより、グルコースの定量が行われる。しかし、上記の方法では、測定対象によっては溶存酸素濃度の影響を

大きく受け、また酸素のない条件下では測定が不可能となる。そこで、酸素を電子メディエータとして用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体などの金属錯体や有機化合物を電子メディエータとして用いるタイプのグルコースセンサが開発されている。

【0004】このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子メディエータの還元体を電極で酸化し、その酸化電流値からグルコース濃度を求めることができる。このようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を用いることで、様々な物質に対する測定が原理的には可能である。例えば、酸化還元酵素にコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよびコレステロールエステラーゼを用いれば、各種医療機関で診断指針に用いられる血清中コレステロール値を測定することができる。コレステロールエステラーゼの酵素反応の進行は非常に遅いので、適切な界面活性剤を添加することにより、コレステロールエステラーゼの活性を向上させ、全体の反応に要する時間を短縮することができる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記したような電子メディエータの一つであるフェリシアン化カリウムを単独または他の反応層構成成分とともに溶媒に溶解し、この溶液を基板の反応層形成位置に滴下し、温風乾燥して層を形成すると、フェリシアン化カリウムは、長手方向の大きさが1mm以上の針状になって析出する。そのため、得られる反応層の形状を不均一なものとし、センサの測定精度を悪化させる原因になっていた。また、コレステロールセンサにおいては、反応層は、グルコースセンサに比べて酵素を高濃度に含むため、反応層形成用液を温風乾燥などにより反応層を形成した場合、試料液への溶解が遅く、応答性を悪化させたりする原因となっていた。本発明は、上記課題に鑑み、高精度で、かつ高濃度域における基質の応答性が優れたバイオセンサを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、フェリシアン化カリウムのように水溶液からの乾燥により結晶として析出するなどの試薬あるいは高濃度の酵素を含む反応層を形成するには、当該反応層を形成する材料を昇華性を有する物質からなる溶媒に溶解し、その溶液を反応層形成位置に配置し、これを凍結した後、減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する方法を採ることにより、表面積が大きく、試料液に溶解しやすい反応層が得られることを見いだしたことに基づくものである。本発明は、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極

系上またはその近傍に、単独または複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法であって、前記試薬系中の特定の少なくとも1種の試薬を含む反応層を形成する工程が、

- 1) 当該特定の反応層を形成する試薬を、昇華性を有する物質からなる溶媒に溶解する工程、
- 2) 得られた溶液を前記反応層の形成位置に配置する工程、
- 3) 前記溶液を凍結する工程、および
- 4) 減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなるバイオセンサの製造方法を提供する。

【0007】本発明の好ましい態様において、前記特定の反応層は、前記反応試薬系を構成する試薬のすべてを含む。本発明の他の好ましい態様において、複数の反応層を有し、そのうちの特定の反応層のみが前記試薬系中の特定の少なくとも1種の試薬を含む。本発明のさらに他の好ましい態様において、前記試薬系中の特定の少なくとも1種の試薬が、複数層に積層された反応層の最上層のみに含まれ、前記複数層に積層された反応層を形成する工程が、前記最上層を除きその下層までを形成する工程、昇華性を有する物質からなる溶媒に前記特定の試薬を溶解し、その溶液を前記工程で形成された層上に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなる。

【0008】ここにおいて、前記基板上において基板との間に試料液を前記電極系へ導く試料液供給路を形成するカバー部材を有し、前記反応層が前記試料液供給路に露出するように形成され、かつ反応層の少なくとも1つが前記カバー部材側に形成されていることが好ましい。前記反応層の少なくとも最下層が親水性高分子を含むことが好ましい。本発明の他の好ましい態様において、前記酸化還元酵素がコレステロールの酸化反応を触媒する酵素であり、前記電子メディエータが前記酵素を含む層とは異なる層に含まれている。本発明のさらに他の好ましい態様において、前記酸化還元酵素がコレステロールの酸化反応を触媒する酵素であり、前記酵素を含む層がさらに界面活性剤を含む。本発明の好ましい態様において、前記特定の試薬が、酸化還元酵素および電子メディエータのフェリシアン化カリウムの少なくとも一方である。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明は、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極系上またはその近傍に、単独または複数の反応層として形成されたバイオセンサの製造方法であって、前記反応層を形成する工程が、昇華性を有する物質からなる

溶媒に溶解した前記試薬の溶液を前記反応層の形成位置に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなることを特徴とするバイオセンサの製造方法に関する。

【0010】本発明は、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極系上またはその近傍に、複数の反応層として形成され、かつそのうちの特定の反応層のみが前記試薬系中の特定の少なくとも1種の試薬を含むバイオセンサの製造方法であって、前記特定の反応層を形成する工程が、昇華性を有する物質からなる溶媒に前記特定の反応層が含む試薬を溶解し、その溶液を前記反応層の形成位置に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなることを特徴とするバイオセンサの製造方法を提供する。また、本発明は、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応試薬系を具備し、前記反応試薬系を構成する試薬が前記電極系上またはその近傍に、単独または複数の反応層として形成され、かつ前記試薬系中の特定の少なくとも1種の試薬が複数層に積層された特定の反応層の最上層のみに含まれるバイオセンサの製造方法であって、前記特定の反応層を形成する工程が、前記最上層を除きその下層までを形成する工程、昇華性を有する物質からなる溶媒に前記特定の試薬を溶解し、その溶液を前記工程で形成された層上に配置する工程、前記溶液を凍結する工程、および減圧下において前記凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去する工程からなることを特徴とするバイオセンサの製造方法を提供する。

【0011】上記のように、本発明は、特定の試薬を含む、反応層または複数層に積層された反応層の最上層を、前記特定の試薬を含む層形成材を昇華性を有する物質に溶解し、その溶液を凍結した後、その凍結された溶液の固形物中の溶媒を昇華させて除去することにより形成する。この方法によると、ほぼ均一な微粉末で構成され、かつ表面積が大きい多孔質構造を有する層を得ることができる。そのため、試料液による反応層の溶解性を向上させることができ、測定に要する時間を短くすることが可能となる。特に試料液中の基質濃度が高い場合に有効である。すなわち、試料液中の基質濃度が高いと、試料液の粘度が高く、従来の反応層では溶解しにくい、本発明によれば基質濃度が高い場合でも試料液への溶解性が向上する。

【0012】反応試薬系を構成する試薬のうち、特に電子メディエータにこの方法を用いることが有効である。電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウムの

他、コレステロールオキシダーゼなどの酸化還元酵素との電子伝達能を有するレドックス化合物から選択して用いることができる。電子メディエータの表面積を大きくし溶解性を高めるために、電子メディエータを単独でセンサに担持させることが好ましい。本発明に用いる昇華性を有する物質からなる溶媒としては、電気化学的に不活性であるか、自身が酸化体であり、電子メディエータや酵素を還元することがなく、かつこれらを変質させないものが好ましい。水が最も使いやすいが、電子メディエータの溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、あるいはパラベンゾキノンなどのキノン類などを用いることもできる。酵素の溶媒としては、水またはバッファーが好ましい。ジメチルホルムアミドの40%程度の水溶液あるいはエタノールの20%程度の水溶液などを用いることもできる。

【0013】用いる酸化還元酵素は、測定対象物質を基質とする酵素であり、グルコースを測定対象とするセンサでは、グルコースオキシダーゼを用いる。診断指針に用いられる血清中のコレステロール値を測定するには、コレステロールの酸化反応を触媒する酵素コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼとコレステロールエステルをコレステロールに変化させる過程を触媒する酵素コレステロールエステラーゼを用いる。コレステロールエステラーゼの酵素反応の進行は非常に遅いので、適切な界面活性剤を添加することにより、コレステロールエステラーゼの活性を向上させ、全体の反応に要する時間を短縮することができる。

【0014】本発明によるコレステロールセンサの反応層は、親水性高分子を含む層、コレステロールの酸化反応を触媒する酵素を含む層、界面活性剤を含む層、コレステロールエステラーゼを含む層、電子メディエータを含む層などの多層に形成してもよい。また、界面活性剤、コレステロールの酸化反応を触媒する酵素、およびコレステロールエステラーゼは、混合層として1つの層にして形成してもよい。これらの反応層は、同じ構成のものを分割するか、構成成分を分けて複数箇所に形成することができる。これらの層は、センサ内の電極系上またはその近傍の位置に配置する。電極系を設けた基板に組み合わされて基板との間に電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材を有するセンサでは、前記試料液供給路に露出する部分や試料液供給路の開口部などに設けることができる。いずれの位置であっても、導入された試料液によって反応試薬層が容易に溶解して電極系に到達できることが好ましい。電極を保護し、形成される反応層の剥離を抑制するために、電極系上に接して親水性高分子層が形成されることが好ましい。また、電極系以外でも、反応層を形成する際の下地として親水性高分子層が形成されるか、最下層の反応層に親水性高分子が含まれることが好ましい。電子メディエータを含む層は、溶解性を高めるために、界面活性剤

と分離することが好ましい。また、保存安定性のために、コレステロールの酸化反応を触媒する酵素コレステロールエステラーゼと分離することが好ましい。

【0015】血糖値を測定するバイオセンサでは、試料液が反応層へ導入されるのを容易にするため、電極系上に形成された層などを被覆するように、脂質を含む層を形成する例がある（たとえば特開平2-062952号公報）。本発明のコレステロールを測定するバイオセンサでは、界面活性剤が含まれ、これが脂質と同様の役割も果たすため、脂質層はなくてもよい。親水性高分子として、水溶性セルロース誘導体、特にエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースの他、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ゼラチン、ポリアクリル酸およびその塩、デンプンおよびその誘導体、無水マレイン酸の重合体およびその塩、ポリアクリルアミド、メタクリレート樹脂、ポリ-2-ヒドロキシエチルメタクリレートなどを用いることができる。

【0016】界面活性剤には、 n -オクチル- β -D-チオグルコシド、ポリエチレングリコールモノドデシルエーテル、コール酸ナトリウム、ドデシル- β -マルトシド、ジュークローズモノラウレート、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、N,N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)デオキシコールアミドおよびポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルから選択することができる。脂質としては、使用する場合、レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質で、両親媒性脂質が好適に用いられる。また、酸化電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二電極方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

【0017】以下、具体的な実施の形態により本発明をより詳細に説明する。図1は反応層を除いたバイオセンサの分解斜視図である。1はポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板を示す。この基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷してリード2、3を形成してある。基板1上には、さらに樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷することにより、測定極4と対極5を含む電極系、および絶縁性ペーストを印刷することにより絶縁層6を形成してある。絶縁層6は、測定極4および対極5の露出部分の面積を一定とし、かつリードを部分的に覆っている。この絶縁性基板1に、空気孔14を備えたカバー12およびスペーサ11を図1中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、コレステロールセンサを作製する。スペーサ11には、基板1とカバー12との間に試料液供給路を形成するためのスリット15が設けてある。13は、その試料液供給路の開口部に相当する。

【0018】図2は、第1の実施の形態におけるセンサ

の縦断面図である。絶縁性基板1上の電極系上に、親水性高分子層7が形成されている。この親水性高分子層7は、親水性高分子の水溶液を滴下し、温風乾燥により形成することができる。この親水性高分子層7の上に、反応試薬を含む反応層8が形成されている。反応層8は、コレステロールセンサにおいては、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤および電子メディエータを含んでいる。これらの試薬を含む水溶液を親水性高分子層7の上に滴下し、凍結させた後、減圧下で乾燥することにより水分を昇華させて形成したものである。

【0019】図3は、第2の実施の形態におけるセンサの縦断面図である。絶縁性基板1上の電極系上に、前記と同様にして親水性高分子層7が形成されている。この親水性高分子層7上、およびカバー12の試料液供給路に露出する面に、それぞれ反応層8aおよび8bが形成されている。これらの反応層8aおよび8bは、それぞれの層を形成する材料の水溶液を所定の位置に滴下し、凍結させた後、減圧下で乾燥することにより水分を昇華させて形成したものである。コレステロールセンサにおいては、反応層8aはコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、および界面活性剤を含み、反応層8bは電子メディエータを含んでいる。他の実施の形態においては、反応層8aはコレステロールオキシダーゼ、およびコレステロールエステラーゼを含み、反応層8bは、界面活性剤、および電子メディエータを含んでいる。さらに他の実施の形態においては、上記の反応層8、8a、または8bを複数の層の積層体として構成し、その積層体の少なくとも最上層は、そこに含まれる試薬の水溶液の凍結、および水分の昇華による除去の工程を経て作製する。この最上層に含める試薬には、例えば水溶液の温風乾燥によると結晶が粗大化するフェリシアン化カリウムが選ばれる。反応層8bには親水性高分子を含ませるか、親水性高分子層を形成した上に反応層8bを形成するのが層の剥離を防ぎ好ましい。

【0020】

【実施例】《実施例1》図3の構成を有するコレステロールセンサで、反応層8aが電子メディエータを含み、反応層8bがコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、および界面活性剤を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。まず、基板1の電極系上に、カルボキシメチルセルロースのナトリウム塩（以下、CMCと略す）の0.5wt%水溶液を5 μ l滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させることによりCMC層7を形成した。次に、フェリシアン化カリウムの1M水溶液1 μ lをCMC層7上に滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させることにより、フェリシアン化カリウムを含む反応層8aを形成した。

【0021】ノカルジア由来のコレステロールオキシダーゼ(EC1.1.3.6、以下ChODと略す)とシ

ユードモナス由来のコレステロールエステラーゼ (E C. 3. 1. 1. 13、以下ChEと略す) を溶解した水溶液に、界面活性剤であるポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (Triton X-100) を添加した。この混合水溶液を、カバー12とスペーサ11を組合せたカバー部材のスリット15により形成される凹部に2.5 μ l滴下し、-196℃の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、4ユニット(U)のコレステロールオキシダーゼ、10Uのコレステロールエステラーゼおよび3wt%の界面活性剤を含む反応層8bを形成した。この層8bは、混合水溶液2.5 μ lを滴下した直後の外形を保持したままの状態であり、多孔質で非常に表面積の大きい構造を有していた。その後、前記のカバー部材を基板に接着することにより、コレステロールセンサを作製した。

【0022】こうして作製したコレステロールセンサに、試料液として、コレステロールおよびコレステロールエステル的一种であるリノール酸コレステロールを含むコレステロール標準液1 μ lを試料液供給路の開口部13より供給し、3分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。その結果を図4に示す。

【0023】《実施例2》図3の構成を有するコレステロールセンサで、反応層8aが電子メディエータを含み、反応層8bがコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤および0.125wt%のCMCを含む。このセンサの作製手順を以下に示す。実施例1と同様にして、絶縁性基板1上の電極系上にCMC層7を形成した。次に、フェリシアン化カリウムを水に溶解させた水溶液を、CMC層7上に1 μ l滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させることによりフェリシアン化カリウムを含む層8aを形成した。一方、ChOD、ChE、界面活性剤およびCMCを水に溶解させて混合水溶液を調製した。カバーとスペーサを組合せたカバー部材のスリット15により形成される凹部に前記混合水溶液を2.5 μ l滴下し、-196℃の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、ChOD、ChE、界面活性剤およびCMCを含む反応層8bを形成した。なお、ここに用いたフェリシアン化カリウム、界面活性剤、ChODおよびChEの量は、実施例1と同じであり、以下の実施例3、4および比較例においても同じである。こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図4に示す。

【0024】《実施例3》図3の構成を有するコレステロールセンサで、反応層8bが電子メディエータを含

み、反応層8aがコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。実施例1と同様にして、絶縁性基板1上の電極系上にCMC層7を形成した。次に、ChOD、ChEおよび、界面活性剤を水に溶解させて混合水溶液を調製し、この混合水溶液2.5 μ lをCMC層7上に滴下し、-135℃の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収容して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることによりChOD、ChEおよび、界面活性剤を含む層8aを形成した。一方、フェリシアン化カリウムを水に溶解させた水溶液を、カバーとスペーサを組合せたカバー部材のスリット15により形成される凹部に1 μ l滴下し、-196℃の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、フェリシアン化カリウムを含む反応層8bを形成した。こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図4に示す。

【0025】《実施例4》図3の構成を有するコレステロールセンサで、反応層8aが電子メディエータを含み、反応層8bがコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含む。このセンサの作製手順を以下に示す。実施例1と同様にして、絶縁性基板1上の電極系上にCMC層7を形成した。次に、フェリシアン化カリウムを水に溶解させた水溶液1 μ lをCMC層7上に滴下し、-196℃の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収容して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより層8aを形成した。一方、ChOD、ChEおよび、界面活性剤を水に溶解させて混合水溶液を調製した。この混合水溶液2.5 μ lを、カバーとスペーサを組合せたカバー部材のスリット15により形成される凹部に滴下し、-135℃の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で3時間乾燥させることにより、ChOD、ChEおよび、界面活性剤を含む層8bを形成した。こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図4に示す。

【0026】《比較例》実施例1と同様にして、絶縁性基板1上の電極系上にCMC層を形成した。次に、フェリシアン化カリウム、界面活性剤、ChOD、およびChEを水に溶解させて混合水溶液を調製した。この混合水溶液4.5 μ lをCMC層上に滴下し、50℃で15分間温風乾燥することにより、フェリシアン化カリウム、界面活性剤、ChOD、およびChEを含む反応層を形成した。こうして、実施例1と同様にして、コレステロールセンサを作製し、試料液を供給してから電圧を

11

印加するまでの時間を変化させて、各試料濃度に対する応答電流値を測定した。その結果を図4に示す。

【0027】

【発明の効果】本発明によれば、表面積の大きい構造を有する反応層を構成することができるので、反応層の溶解が速やかに行われることになり、基質濃度が高濃度域でも応答特性の優れたバイオセンサを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例におけるバイオセンサの反応層 10 を除いた分解斜視図である。

【図2】同要部の縦断面図である。

【図3】本発明の他の実施例におけるバイオセンサの要部の縦断面図である。

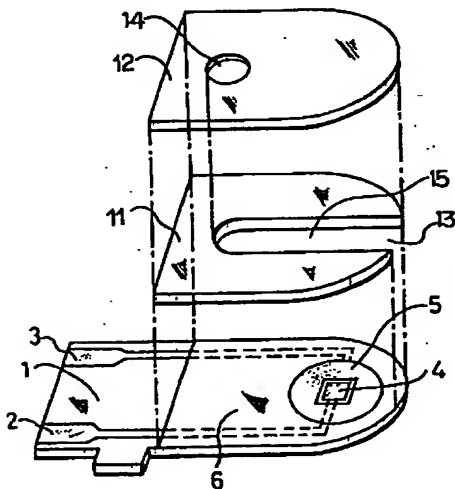
【図4】実施例および比較例におけるコレステロールセ

ンサの応答特性を示す図である。

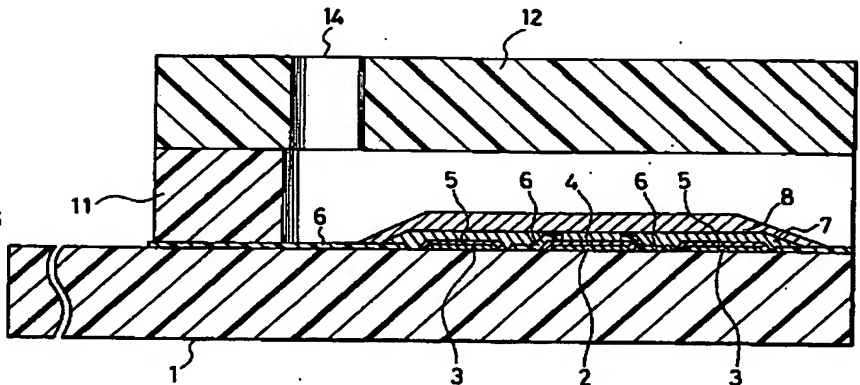
【符号の説明】

- 1 絶縁性基板
- 2、3 リード
- 4 測定極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 親水性高分子層
- 8、8 a、8 b 反応層
- 11 スペーサ
- 12 カバー
- 13 試料液供給路の開口部
- 14 空気孔
- 15 スリット

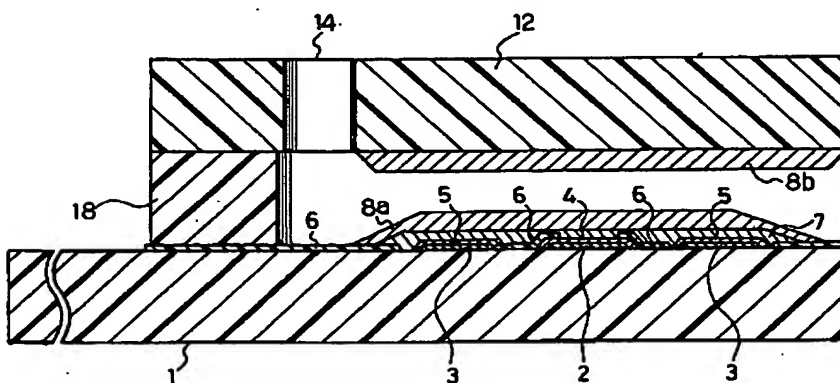
【図1】



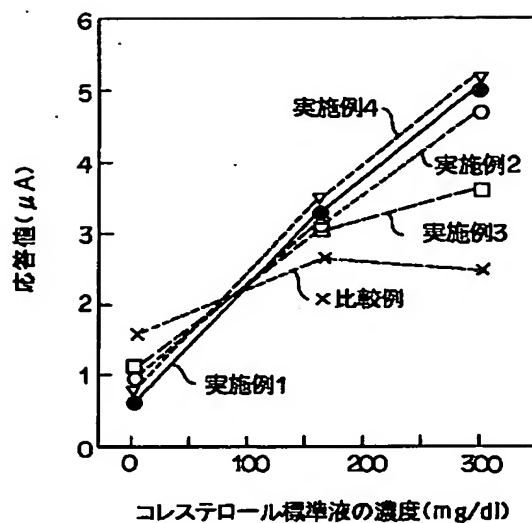
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 渡邊 基一
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 池田 信
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 南海 史朗
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

Fターム(参考) 2G045 DA31 DA69 FB01 FB05 GC20